

420 Rec'd PCT/PTO 29 OCT 1999

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICECERTIFICATE OF TRANSLATION

Honourable Commissioner of
Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Sir:

I, JOHN CHARLES McGILLEY, B.A. A.I.T.I., Technical Translator, of c/o
Priory Translations Limited, 11, Magdalen Street, Colchester, Essex, England,
hereby state:

THAT I am well acquainted with the French and English languages.

THAT I translated the document identified as PCT Patent Application No.
PCT/FR98/00883 filed on 30th April 1998, from French into English;

THAT the attached English translation is a true and correct translation of PCT
Patent Application No. PCT/FR98/00883

to the best of my knowledge and belief; and

THAT all statements made of my own knowledge are true and that all
statements made on information and belief are believed to be true and further,
that these statements are made with the knowledge that wilful false statements
and the like are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001
of Title 18 of the United States Code



JOHN CHARLES McGILLEY



BREVET D'INVENTION

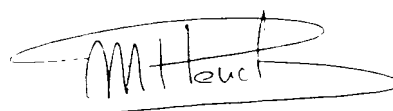
CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

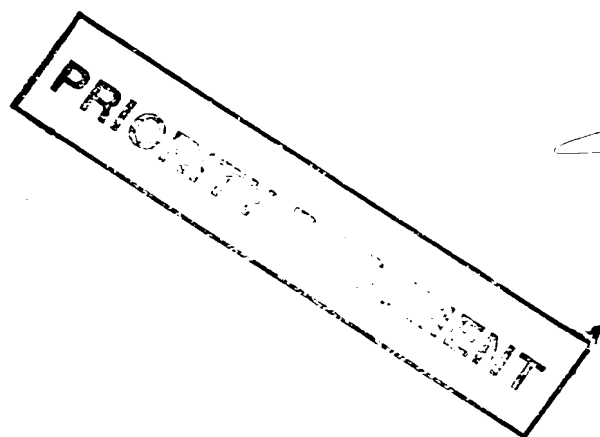
Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 04 MAI 1998

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département



Martine PLANCHE



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
25 bis, rue de Saint Petersburg
75013 PARIS Cedex 08
Téléphone : (1) 53 74 53 04
Télécopie : (1) 42 92 54 37



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75

DATE DE DÉPÔT

30 AVR. 1997

97 054 11 -

30 AVR. 1997

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet ARMENGAUD AINE

3, Avenue Bugeaud

75116 PARIS

n° du pouvoir permanent références du correspondant

téléphone

59023

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention☐ demande divisionnaire☐ certificat d'utilité☐ transformation d'une demande
de brevet européen

demande initiale

☐ brevet d'invention☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui☒ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Nouveaux polypeptides associés à des récepteurs activateurs et leurs applications
biologiques

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

(I.N.S.E.R.M.)

Forme juridique

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

101, rue de Tolbiac

75654 PARIS CEDEX 13

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Mandataire : Alain ARMENGAUD

n° 92-1003

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

Coopérative de Saint-Rémy-l'Aug
13000 Saint-Rémy-l'Aug
Tél. 04 91 53 04 53 - Fax 04 91 53 04 54

97/05411

TITRE DE L'INVENTION : NOUVEAUX POLYPEPTIDES ASSOCIÉS A DES RECEPTEURS
ACTIVATEURS ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES

LE(S) SOUSSIGNÉ(S) Madame PEAUCELLE Chantal

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) 1) VIVIER Eric 2) MORETTA Alessandro

1) VIVIER Eric
23 Bd J. Jaurès
13260 CASSIS
FRANCE

2) MORETTA Alessandro
Via Nizza 18/8
16136 GENOVA
ITALIE

3) OLCESE Lucia
64 Bd de la Concorde
13009 MARSEILLE
FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient, lorsque celle-ci est différente de la société dépositaire du brevet.

Date et signature (si du (des) demandeur(s) ou du mandataire)

Le 29 mai 1997

N° 92-1189

Chantal

1

NOUVEAUX POLYPEPTIDES ASSOCIES A DES RECEPTEURS ACTIVATEURS ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES

L'invention porte sur de nouveaux polypeptides capables de transduire un signal provenant d'un récepteur activateur pour des molécules du CMH de classe I, fonctionnant en tant que récepteur autonome ou en tant que co-récepteur, et d'un KAR (*Killer-cell Activatory Receptor*) en particulier, sur les anticorps obtenus à partir desdits polypeptides servant d'immunogènes, et sur les acides nucléiques correspondant auxdits polypeptides.

L'invention porte également sur les procédés d'obtention de tels polypeptides et sur les applications biologiques, plus particulièrement, préventives, thérapeutiques et diagnostiques, desdits polypeptides, anticorps et acides nucléiques.

Pour maintenir la cohérence et assurer l'intégrité de l'organisme, le système immunitaire doit mettre en jeu un système coordonné de communications intercellulaires.

Différents types de récepteurs interviennent dans ces communications.

Trois d'entre eux, à savoir les récepteurs pour l'antigène des lymphocytes B (BCR), les récepteurs pour l'antigène des lymphocytes T (TCR) et les récepteurs reconnaissant la portion Fc des anticorps (RFc), sont maintenant bien décrits et leurs différentes structures relativement bien connues.

D'autres récepteurs qui ne sont ni récepteurs pour antigènes, ni récepteurs pour anticorps ont été décrits mais leurs structures et mécanismes d'action sont encore mal connus.

Il s'agit de récepteurs pour des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) tels que les KARs (*Killer cell Activatory Receptors*) et leur contrepartie inhibitrice, les KIRs (*Killer cell Inhibitory Receptors*).

KARs et KIRs ne sont pas limités aux cellules NK : ils sont également naturellement exprimés par des cellules T.

Les KARs sont hautement homologues aux KIRs (jusqu'à 96% d'homologie entre KARs et KIRs au niveau extracytoplasmique).

5 KARs et KIRs n'assurent cependant pas les mêmes fonctions : les KIRs sont impliqués dans le contrôle négatif (inhibiteur) de l'activation des cellules NK et T, alors que les KARs sont impliqués dans le contrôle positif (stimulateur) de l'activation des cellules NK et T.

10 Des différences majeures au niveau des domaines trans- et intracytoplasmiques ont pu être mises en évidence entre isoforme activatrice (KAR) et isoforme inhibitrice (KIR).

15 En effet, contrairement aux KIRs, les KARs expriment un résidu acide aminé chargé (lysine) dans leur domaine transmembranaire et ne contiennent aucun motif ITIM (motif d'inhibition de récepteur basée sur résidu(s) tyrosine) dans leur domaine intracytoplasmique. Les récepteurs monomériques KARs ne contiennent pour autant pas de motif ITAM (motif d'activation d'immunorécepteur basée sur résidu(s) tyrosine).

20 La situation observée pour les KARs, récepteurs activateurs pour les molécules du CMH et membres de la IgSF (superfamille des immunoglobulines), à savoir récepteur activateur, contrepartie d'un récepteur inhibiteur à ITIM, ne présentant lui-même ni ITIM, ni ITAM mais présentant un acide aminé chargé (lysine, arginine, acide aspartique, acide glutamique) transmembranaire, peut être observée pour d'autres types de récepteurs. Il en est ainsi des récepteurs activateurs (ou à tout le moins non inhibiteurs) pour les molécules du CMH, tels
25 que NKG2C/D (qui est du type lectine et dont la contrepartie inhibitrice est NKG2A/B), mais aussi pour d'autres récepteurs non inhibiteurs, tels que SIRP β

et ILT 1, dont les ligands sont encore inconnus et qui ont été décrits notamment sur des cellules non-hématopoïétiques.

Les KARs peuvent fonctionner en tant que récepteurs autonomes pour les molécules du CMH de classe I. On sait ainsi que l'engagement des KARs avec des molécules du CMH de classe I exprimées sur la surface de cellules cibles, initie les programmes d'activation lymphocytaires tel qu'il a été établi du fait de la mobilisation du Ca^{2+} intracytoplasmique et de l'induction de la lyse des cellules cibles.

Outre leurs fonctions de récepteurs autonomes pour des molécules du CMH, les KARs peuvent également assurer des fonctions co-réceptrices pour des récepteurs TCR et RFc (Mandelboim O. *et al.*, 1996, *Science* 274:2097 ; Cambiaggi A. *et al.*, 1996, *Blood* 87:2369).

En effet, lors de la reconnaissance de fragments constants (Fc) d'immunoglobulines G (IgG) par des récepteurs tels que CD16 (RFcγIII), et lors de la reconnaissance d'antigènes par le complexe CD3/TCR restreint par des molécules du CMH de classe I ou II, les KARs peuvent jouer le rôle de co-récepteurs et ainsi augmenter l'intensité de la réponse cellulaire, en particulier face à de petites quantités d'antigènes, maintenir la réponse cellulaire dans le temps, et également coopérer à la stimulation de la prolifération cellulaire.

Les KARs participent donc à la régulation du système immunitaire non seulement en "auto-réaction" face à des protéines endogènes, c'est-à-dire synthétisées par la cellule présentatrice (telles que protéines issues d'agents pathogènes, virus, bactéries, parasites mais se multipliant à l'intérieur de cellules-hôtes) mais également en "allo-réaction" face à des protéines exogènes et face à des anticorps libérés dans l'organisme.

Le rôle des KARs, naturellement exprimés sur des sous-populations lymphocytaires NK et T, n'est donc pas restreint par leurs ligands propres, à

savoir les molécules du CMH de classe I, mais s'étend à l'équilibre du système immunitaire de manière générale.

Le fonctionnement des KARs naturellement exprimés influe ainsi sur la prolifération de cellules NK et T, la production par de telles cellules de substances de type cytokines, la lyse de cellules cibles telles que cellules autologues délétères, malignes ou infectées par des virus, cellules allogéniques, mais aussi sur la tolérance du système immunitaire face à certains antigènes.

Tout non- ou dys-fonctionnement des KARs peut donc conduire à différentes pathologies ou réactions indésirées, toutes liées au fonctionnement du système immunitaire, telles que maladies d'immuno-déficience, maladies auto-immunes (*e.g.* sclérose en plaque), tumeurs, infections virales, bactériennes, parasitaires, allergies, rejets de greffe. Il a, par exemple, été montré que si l'homme ne présente en moyenne que moins de 10% de lymphocytes exprimant des KARs, la quasi-totalité des lymphocytes de patients atteints de LDGL (maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires) exprime des KARs.

La présente invention a pour but de fournir des moyens permettant de diagnostiquer un fonctionnement anormal ou non désiré de récepteurs activateurs pour des molécules du CMH de classe I tels que les KARs et d'en contrôler le fonctionnement.

L'invention a ainsi pour objet de nouveaux polypeptides qui sont nécessaires à la transduction d'un signal provenant d'un KAR, ainsi que les anticorps et acides nucléiques obtenus à partir desdits nouveaux polypeptides.

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention desdits nouveaux polypeptides ainsi que leurs applications biologiques.

Les polypeptides de l'invention sont caractérisés en ce qu'ils sont tels qu'obtenus :

i. par immunoprécipitation d'une ou plusieurs fraction(s) polypeptidique(s) de lysats de cellules NK et/ou T à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR, tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

ii. chaque fraction polypeptidique pouvant optionnellement être plus avant épuisée par élimination des fractions immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et/ou anti-FcεRIγ, et/ou être à nouveau précipitée à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

iii. par résolution des polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire, et récupération des polypeptides correspondant à un poids moléculaire de 12 ± 1 kDa environ, ou bien

par résolution des polypeptides de ladite (desdites) fraction polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire après avoir soumis ladite (lesdites) fraction(s) polypeptidique(s) à un test kinase, et récupération des polypeptides correspondant à un poids moléculaire de 12, 14 et/ou 16 ± 1 kDa environ. Le test kinase peut être réalisée tel que ci-après décrit dans les exemples (cf. matériel et méthodes).

De tels polypeptides peuvent également être obtenus, après séquençage, par synthèse chimique ou à l'aide des techniques d'ADN recombinant.

Les polypeptides selon l'invention comprennent également les homologues de tels polypeptides, tels qu'obtenus par délétion, insertion, inversion ou substitution conservatrice d'acides aminés, et les fragments de tels polypeptides, tels qu'obtenus par hydrolyse desdits polypeptides à l'aide de protéases, lesdits

homologues ou fragments étant capables de transduire un signal provenant d'un KAR.

Lesdits peptides, ci-après appelés KARAPs (*KAR-Associated Proteins*), sont nécessaires à la transduction de signaux provenant de récepteurs activateurs, les KARs, qui ne présentent ni ITIM ni ITAM intracytoplasmiques mais qui
5 présentent un résidu acide aminé transmembranaire.

Dans une forme de réalisation de l'invention, lesdits polypeptides se présentent sous la forme de dimères liés par un pont disulfure ; ils s'associent de manière sélective et non covalente à des KARs qui fonctionnent, soit en tant que
10 récepteurs autonomes pour des molécules du CMH de classe I, soit en tant que co-récepteurs du TCR ou d'un RFc tel que CD16.

Les polypeptides selon l'invention peuvent être phosphorylés au niveau d'au moins un résidu tyrosine et/ou d'au moins un résidu sérine, ou être non phosphorylés.

Les polypeptides selon l'invention sont capables de se lier à une molécule à
15 domaine SH2 telle que ZAP-70, p72^{syk}, p56^{lck}, p59^{lyn}, p60^{lyn}, Grb-2, pp³⁶⁻³⁸, PLC- α 1, p85 (PI-3 kinase), Shc, ou à une molécule à domaine PTB (*PhosphoTyrosine Binding*) telle que Shc. Une telle liaison peut être observée par incubation de polypeptides selon l'invention avec des molécules à domaine SH2 ou PTB et
20 mesure de la résonance de plasmons (Olcese *et al.* 1996, The Journal of Immunology 156:4531-4534).

Selon une disposition avantageuse, les polypeptides de l'invention sont modifiés par glycosylation, phosphorylation, sulfonation, biotinylation, acylation, estérification, ou par addition, substitution, suppression d'entités de forme
25 moléculaire proche de celle des groupes phosphate, telles que le phosphonate, par addition de réactifs de marquage tels que la luciférase, la GFP (*Green Fluorescence Protein*), par addition de cibles de purification telles qu'un ligand

d'affinité, par addition d'entités modifiant sa solubilité. De manière particulièrement avantageuse, les polypeptides de l'invention sont modifiés de manière à être non hydrolysables dans des conditions biologiques.

5 Selon une autre disposition avantageuse, les polypeptides de l'invention, ou leurs fragments ou homologues, sont capables de traverser une membrane cellulaire, c'est-à-dire une bicouche lipidique.

10 La présente invention vise également les anticorps et fragments de tels anticorps, en particulier fragment Fc, Fv, Fab, F(ab)'₂, obtenus par immunogénèse à partir d'un polypeptide selon l'invention ou à partir d'un fragment ou homologue d'un tel polypeptide.

15 De tels anticorps sont obtenus par immunisation d'animaux, tels que lapins et souris, contre des polypeptides selon l'invention tels qu'obtenus par élution de bandes électrophorétiques, par synthèse chimique ou par une technique de protéines de fusion solubles (GST), lesdits polypeptides, fragments ou homologues étant optionnellement couplés à des immunogènes tels que l'ovalbumine.

20 Des anticorps monoclonaux sont alors produits par fusion hybridomale des cellules spléniques immunes, criblage et purification des surnageants de culture (Köhler et Milstein, 1975, Nature 256, 495-497 ; Antibodies, a laboratory manual, 1988, Harlow and David Lane, Ed. Cold Spring Harbor laboratory).

A partir de ces anticorps, des dianticorps peuvent être générés selon des procédures standards.

25 La présente invention vise également les acides nucléiques comprenant une séquence correspondant à la lecture en cadre ouvert, selon le code génétique universel et en tenant compte de la dégénérescence dudit code, de la séquence en acides aminés d'un polypeptide selon l'invention et les variants présentant une homologie supérieure ou égale à 60% avec de tels acides nucléiques et étant

capables de coder pour une molécule transductrice d'un signal activateur provenant d'un KAR.

La présente invention vise également un procédé d'obtention d'un polypeptide selon l'invention comprenant les étapes :

- 5 i. d'immunoprécipiter une ou plusieurs fraction(s) polypeptidique(s) de lysats de cellules NK et/ou T à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR, tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,
- 10 ii. chaque fraction polypeptidique pouvant optionnellement être plus avant épuisée par élimination des fractions immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et/ou anti-Fc ϵ RI γ , et/ou être à nouveau précipitée à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,
- 15 iii. de séparer les polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire et récupérer les polypeptides correspondant à un poids moléculaire de 12 ± 1 kDa environ, ou bien
 de séparer les polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire après avoir soumis ladite (lesdites)
20 fraction(s) polypeptidique(s) à un test kinase, et récupérer les polypeptides correspondant à un poids moléculaire de 12, 14 et/ou 16 ± 1 kDa environ.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant, en association avec un véhicule pharmaceutiquement inerte, une quantité efficace d'au moins un polypeptide selon l'invention ou de fragments d'un
25 tel polypeptide, d'au moins un anticorps selon l'invention ou de fragments d'un tel anticorps, ou d'au moins un acide nucléique selon l'invention ou de variants d'un tel acide nucléique.

L'utilisation desdits anticorps et acides nucléiques, en tant qu'agents de diagnostic, entre également dans le champ de l'invention.

La composition pharmaceutique selon l'invention peut être formulée sous forme solide, liquide ou sous forme d'une suspension, pour une administration
5 orale, parentérale, topique, intravaginale, intrarectale ou pour une inhalation orale et/ou nasale.

Ladite composition pharmaceutique est destinée à moduler l'activité d'un KAR. Pour stimuler l'activité d'un KAR, ladite composition pharmaceutique comprendra des agents facilitant la transduction du signal provenant dudit KAR, tels que, par exemple, polypeptides ou acides nucléiques selon l'invention
10 capables de traverser une bicouche lipidique. Pour inhiber l'activité d'un KAR, ladite composition pharmaceutique comprendra des agents bloquant la transduction des signaux issus dudit KAR tels que, par exemple, des fragments d'anticorps selon l'invention capables de traverser une bicouche lipidique de
15 manière à bloquer les KARAPs cellulaires, ou des polypeptides phosphorylés ou non, modifiés selon l'invention, par exemple non hydrolysables dans des conditions biologiques, de manière à bloquer des protéines à domaine SH2 ou PTB ou toute molécule adaptatrice ou effectrice de l'activation dudit KAR.

Pour déterminer au niveau d'une cellule si un signal provenant d'un KAR
20 est ou non transduit, et pour déterminer si un tel signal est stimulé ou inhibé, de nombreux moyens sont à la disposition de l'homme du métier. Des exemples de tels moyens incluent la stimulation dudit KAR par un ligand et la mesure des cytokines secrétées (*cf.* par exemple, Cambiaggi *et al.* 1996, Blood 87:2369), de la prolifération cellulaire (*cf.* par exemple Mandelboim *et al.* 1996, Science
25 274:2097), de la cytotoxicité (*cf.* par exemple le test de cytotoxicité redirigée ci-après décrit), de la mobilisation du calcium intracytoplasmique (*cf.* par exemple

Bléry *et al.*, 1997, J. Biol. Chem. 272, 8989-8996), et/ou de l'induction de phosphorylation (*cf.* par exemple Vivier *et al.* 1991, J. Immunol. 146:206).

La présente invention vise également une méthode de diagnostic *in vitro* d'un fonctionnement anormal ou non désiré d'une cellule comprenant les étapes de :

- mise en contact d'au moins une cellule, ou un extrait de cellule, avec un anticorps selon l'invention ou un fragment d'un tel anticorps, ou avec un acide nucléique selon l'invention ou un variant d'un tel acide nucléique, et de
- révélation du produit de réaction éventuellement formé.

L'étape de mise en contact est réalisée dans des conditions notamment de durée, température, tampon, le cas échéant de réticulation de gel, permettant l'établissement d'une réaction de type antigène-anticorps par exemple par ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbant Assays*), ou le cas échéant, d'une réaction de type hybridation d'acides nucléiques et PCR (amplification en chaîne par polymérase).

Pour la révélation du produit de réaction éventuellement formé, peuvent être utilisés des marqueurs tels que marqueurs fluorescents, enzymatiques, radioactifs ou luminescents.

Ladite méthode de diagnostic *in vitro* permet le diagnostic de fonctionnements cellulaires anormaux ou non désirés pouvant se traduire par une maladie immunoproliférative, une maladie d'immunodéficience telle qu'une maladie à VIH, un cancer tel que la maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires, une maladie auto-immune telle que la polyarthrite rhumatoïde, une maladie infectieuse telle que le paludisme, une réponse allergique, un rejet de greffe.

La présente invention se rapporte également à une méthode d'identification de molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR et une méthode

d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR.

La méthode d'identification de molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR selon l'invention comprend les étapes de :

- 5 i. mise en contact des molécules candidates avec des polypeptides selon l'invention (ou avec des fragments de tels polypeptides), et de
- ii. sélection de celles des molécules candidates pour lesquelles une liaison auxdits polypeptides (ou auxdits fragments de polypeptides) est observée.

10 Les molécules candidates susceptibles d'être des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR peuvent être par exemple choisies parmi les molécules à domaine SH2 ou PTB. Elles peuvent se présenter sous forme recombinante soluble.

15 L'étape de mise en contact peut être, par exemple, réalisée par couplage des molécules candidates, obtenues sous forme recombinante soluble, susceptibles d'être des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR, à des billes permettant la mesure de la radioactivité telles que billes de liquide scintillant, et par passage, sur lesdites billes, de polypeptides selon l'invention (ou de fragments de tels polypeptides) sous forme tritiée. Sont alors
20 sélectionnées celles des molécules candidates pour lesquelles une liaison auxdits polypeptides ou fragments de polypeptides est observée par mesure de la radioactivité (cpm).

L'étape de mise en contact peut également être réalisée par immobilisation de polypeptides selon l'invention (ou de fragments de tels polypeptides) sur des microsupports permettant la mesure de la résonance de plasmons tel que des
25 microsupports BIAcore (Pharmacia) (*cf.* par exemple Olcese *et al.*, 1996, The Journal of Immunology 156:4531-4534 ; Vély *et al.*, Immunology Letters 1996, vol.54. p145-150), et par passage, sur lesdits microsupports, de molécules

candidates susceptibles d'être des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR. Sont alors sélectionnées celles des molécules candidates pour lesquelles une liaison auxdits polypeptides ou fragments de polypeptides est observée par mesure de la résonance de plasmons (Resonance Unit).

5 Cette méthode d'identification des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR, quel qu'en soit son mode de réalisation, peut également servir de référentiel dans la mise en oeuvre de la méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR ci-après décrite.

10 La méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, selon l'invention, comprend les étapes de :

i. mise en contact des molécules candidates avec des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR telles qu'obtenues par la
15 méthode selon l'invention ci-avant décrite et avec des polypeptides selon l'invention (ou avec des fragments de tels polypeptides), et de

ii. sélection de celles des molécules candidates qui exercent un effet sur la liaison entre lesdits polypeptides (ou lesdits fragments de polypeptides) et lesdites molécules adaptatrices ou effectrices, telle qu'observée en l'absence desdites
20 molécules candidates.

Les molécules candidates susceptibles de moduler une activité cellulaire résultant d'un KAR peuvent être choisies parmi des banques de composés naturels ou synthétiques, en particulier parmi des banques chimiques ou combinatoires. Lesdites molécules candidates peuvent être de nature protéique,
25 par exemple, (dérivés ou fragments d'anticorps anti-idiotypes tels que les anticorps selon la présente invention, dérivés ou fragments d'anticorps catalytiques), de nature carbonée, lipidique ou nucléique.

L'étape de mise en contact de la méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, selon l'invention, peut être, par exemple, réalisée par incubation desdites molécules candidates avec des polypeptides selon l'invention (ou de fragments de tels polypeptides) et avec des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR, telles qu'obtenues par la méthode selon l'invention ci-avant décrite, dans des conditions permettant une mesure du taux de liaison entre lesdits polypeptides et lesdites molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR, par exemple, en se basant sur une propriété chimique desdites molécules adaptatrices ou effectrices à l'état non lié, telle que propriété enzymatique, propriété de phosphorylation ou d'auto-phosphorylation.

L'étape de mise en contact de la méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, selon l'invention, peut également être réalisée par mise en oeuvre de techniques du type billes de liquide scintillant et polypeptides tritiés ou du type microsupport et mesure de la résonance de plasmons, telles que ci-avant décrites, en mesurant la radioactivité ou, respectivement, la résonance de plasmons, résultant de la liaison entre lesdits polypeptides et lesdites molécules adaptatrices ou effectrices, en l'absence et en présence des molécules candidates. Sont alors sélectionnées celles des molécules candidates qui soit augmentent soit diminuent de manière statistiquement significative le taux de liaison témoin mesuré entre lesdits polypeptides et lesdites molécules adaptatrices ou effectrices en l'absence desdites molécules candidates.

Les molécules capables de moduler l'activation d'un KAR, telles qu'identifiées par la méthode selon l'invention, peuvent être modifiées chimiquement de manière à les rendre non hydrolysables dans des conditions

biologiques et/ou de manière à ce qu'elles puissent traverser une bicouche lipidique cellulaire.

Les molécules capables de moduler l'activation d'un KAR, selon l'invention, avantageusement agissent en modifiant l'interaction entre lesdits
5 KARAPs et leurs effecteurs ou adaptateurs cellulaires.

Lesdites molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, selon l'invention, peuvent alors être appliquées à une cellule cultivée *in vitro*, telle que cellule lymphocytaire, dont l'activité KAR a été stimulée, par exemple, par mise en contact avec un ligand. Cette application se
10 fait par pénétration à l'intérieur de ladite cellule, par exemple, par électroporation ou par modification chimique permettant le franchissement d'une bicouche lipidique.

La présente invention est illustrée par les exemples suivants qui ne doivent être en aucun cas considérés comme limitatifs.

15 Il y est fait référence aux six figures suivantes:

- la Figure 1 présente

en A, une analyse par cytomètre de flux (FACScan, marque déposée Becton-Dickinson) en immunofluorescence indirecte de cellules cultivées sur IL-2 (interleukine 2) et issues de patients atteints de LDGL (maladie
20 lymphoprolifératrice des lymphocytes granulaires) désignés par R.P., D.F. et MAL., et

en B, les résultats d'un test de cytotoxicité re-dirigé avec différents anticorps monoclonaux, réalisé sur des cellules NK cultivées sur IL-2 provenant de différents donneurs ;

25 - la Figure 2 présente :

en A, une analyse SDS-PAGE (résolution de protéines par électrophorèse sur gel et dodécylsulfate de sodium) réalisée à partir de cellules NK de donneur

R.P. (p50.1⁺) radiomarquées au ¹²⁵I et immunoprécipitées à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-CD158 EB6, avant et après épuisement en FcεRIγ et en CD3ζ à l'aide d'anticorps anti-CD3ζ / anti-FcεRIγ,

en B, une analyse SDS-PAGE avec une sonde anticorps anti-CD3ζ de lysats complets de cellules D.F. ou d'immunoprécipités de tels lysats ;

- la Figure 3 présente :

en A, une analyse SDS-PAGE des protéines phosphorylées issues de tests kinase *in vitro* auxquels ont été soumis des immunoprécipités de lysats de cellules NK MAL.,

en B, le même type d'analyse SDS-PAGE qu'en figure 3A mais réalisée à partir de cellules RBL-2H3 p50.2⁺,

en C, une analyse par électrophorèse sur couche mince (TLE) des acides aminés phosphorylés des bandes KARAPs et CD3ζ excisées après tests kinase *in vitro* réalisés sur des immunoprécipités anti-CD158 et anti-CD16, respectivement, de cellules NK R.P.,

- la Figure 4 présente une analyse SDS-PAGE bidimensionnelle en conditions non-dénaturantes/dénaturantes d'immunoprécipités anti-CD158 de lysats de cellules NK R.P. ayant subi un test kinase, et

- la Figure 5 présente les récepteurs activateurs non-inhibiteurs de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) ou du type lectine, et leurs contreparties inhibitrices.

EXEMPLE

1. Matériels et méthodes

Anticorps monoclonaux (mAbs) et réactifs

Les anticorps monoclonaux suivants ont été utilisés :

- des anticorps anti-CD3, anti-CD16 et anti-CD56 d'isotype IgG1 tels que
 5 JT3A (Coulter Immunotech référence 0178), KD1 (Coulter Immunotech
 référence 0813) et TA181.H12 (Coulter Immunotech référence 1844),
 respectivement,

- des anticorps anti- CD3 ζ tels que TIA-2 (Coulter Immunotech 66045P2),

- des anticorps anti-CD158, à savoir des anticorps anti-p58.1 tels que EB6
 10 (Coulter Immunotech référence 1847), des anticorps anti-p58.2 tels que GL183
 (Coulter Immunotech référence 1846) et des anticorps anti-p50.3 tels que
 PAX250 décrit dans Bottino *et al.* (*Eur. J. Immunol.* 1996, 26, 1816),

- un antisérum de lapin anti-Fc ϵ RI γ tel que l'antisérum 666 décrit dans
 Jouvin M.H. *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 5918-5925,

15 - un antisérum de lapin anti-Fc ϵ RI α tel que l'antisérum BC4 décrit dans
 Bociano L.K. *et al.*, 1986, *J. Biol. Biochem.* 261, 11823-11831,

- un antisérum de chèvre anti-souris conjugué à la peroxydase de raifort
 (Sigma A-2304) et un antisérum de chèvre anti-lapin conjugué à la peroxydase de
 raifort (Sigma A-0545),

20 - une immunoglobuline de chèvre anti-souris conjuguée à de
 l'isothiocyanate de fluoresceine (Coulter-Immunotech 0819 F(ab')₂),

- des anticorps monoclonaux GL183-Phycoérythrine (GL183-PE) (Coulter-
 Immunotech 2278), (EB6-Phycoérythrine (EB6-PE) (Coulter-Immunotech 2277)
 et une immunoglobuline de chèvre anti-souris-phycoérythrine (anti-souris-PE)
 25 (Coulter Immunotech 0855 F(ab')₂).

Le tampon de lyse contenait du Tris-HCl 25 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ;
 digitonine 1% ; orthovanadate de sodium 100 μ M ; NaF 10 mM ; aprotinine

2 µg/ml ; leupeptine 2 µg/ml ; tous ces produits ayant été achetés auprès de Sigma (St Louis, MO, USA).

Le tampon kinase contenait de l'Hepes 20mM pH 7,2 ; NaCl 100 mM ; MnCl₂ 5 mM ; MgCl₂ 5mM ; ³²γ ATP 10 µCi = 370 kBq (Amersham, Buckinghamshire, UK).

Le tampon d'électrophorèse sur couche mince (TLE) contenait de l'acide acétique glacial à 10% et de la pyridine à 1% dans de l'eau ; pH 3,5.

Cellules

Cellules NK humaines issues de patients LDGL ou cellules LDGL :

Les cellules NK humaines ont été obtenues à partir de patients atteints de maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires (LDGL, *Lymphoproliferative Disease of Granular Lymphocytes*) de la lignée des cellules NK CD56⁺, CD16⁺, CD3⁻. Des lymphocytes de sang périphérique (PBL, *Peripheral Blood Lymphocyte*) ont été isolés à partir d'échantillons de sang de patients atteints de LDGL par centrifugation selon un gradient Ficoll/Hypaque. Ces cellules LDGL ont été alors cultivées à 37°C à une concentration de 10⁶ cellules par ml sur milieu RPMI-1640, à 10 µg/ml de pénicilline-streptomycine et 10 % de sérum de veau foetal, en présence de cellules nourricières irradiées allogéniques et de 100 U/ml de rIL-2.

Obtention de cellules transfectées RTIIB.p50.2⁺ :

Des transfectants de cellules RBL-2H3 (American Type Culture Collection) exprimant des KARs p50.2 (cellules RTIIB.p50.2⁺) ont été réalisées telles que décrites dans Bléry *et al.* 1997, J. Biol. Chem., 272, 8989-8996).

Brièvement, les cellules RTIIB utilisées sont les cellules classiquement décrites comme étant des cellules RBL-2H3 transfectées de manière à exprimer le récepteur FcγRIIb2 murin et la molécule chimérique CD25/CD3 comprenant les domaines ecto- et trans-membranaires complets de la CD25 humaine liés au domaine intracytoplasmique complet de la CD3 murine.

Ces cellules RTIIB ont été de plus transfectées par électroporation d'ADNc 183.Act2 (codant pour p50.283) porté sur le vecteur d'expression RSV-5gpt.

Des cellules transfectées RTIIB.p50.2⁺ stables ont été établies par culture en présence de xanthine (250 µg/l), d'hypoxanthine (13,6 µg/l) et d'acide mycophénolique (2 µg/l).

Test Cytolytique

L'activité cytolytique des cellules LDGL cultivées sur IL-2 a été mesurée par rapport à la lignée cellulaire murine P815 (American Type Culture Collection) en l'absence ou en présence des mAbs anti-CD16, anti-CD158 et anti-CD56.

Brièvement, 5×10^3 cellules cibles marquées au ⁵¹Cr ont été ajoutées à des dilutions en série de cellules effectrices en présence de 50 µl d'anticorps monoclonal surnageant d'hybridome au démarrage du test standard de libération de ⁵¹Cr durant 4 heures (Vivier E. *et al.*, 1991, J. Immunol. 146:206).

Radio-ioduration

5 Les cellules ($10 - 50 \times 10^6$) ont été fixées au formaldéhyde à 0,5% dans du PBS (tampon de phosphate de sodium), puis perméabilisées pendant 5 minutes à l'aide de digitonine à 30 $\mu\text{g/ml}$ dans du PBS préalablement à une ioduration catalysée par la lactoperoxidase (^{125}I , NEN-Dupont, Wilmington, DE, USA) tel que décrit par Anderson P. *et al.*, 1989, *J. Immunol.* 143:1899.

10 Les cellules ont été lysées pendant 30 minutes à 4°C dans un tampon de lyse à digitonine. Les surnageants post-nucléaires pré-purifiés ont alors été immunoprécipités à l'aide d'anticorps spécifiques couvrant des billes S4B-Sépharose (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) (Vivier E. *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 146:206). Les immunoprécipités ont été analysés par SDS-PAGE (résolution de protéines par électrophorèse sur gel et dodécylsulfate de sodium) et autoradiographie.

Test kinase *in vitro*

20 Les cellules (10×10^6 par échantillon) ont été lysées dans 1 ml de tampon de lyse (voir réactifs). Les surnageants post-nucléaires prépurifiés ont été immunoprécipités pendant 2 à 3 heures en utilisant des anticorps monoclonaux liés de manière covalente à une Sépharose 4B activée par CnBr (Pharmacia). Les complexes immuns ont été lavés trois fois dans du tampon de lyse ; 40 μl de
25 tampon kinase (voir réactifs) ont alors été ajoutés aux immunoprécipités pendant 10 minutes à 37°C. La réaction kinase a été arrêtée par addition du tampon

réducteur SDS-échantillon. Les échantillons ont été portés à ébullition préalablement à une analyse par SDS-PAGE et autoradiographie. Dans certaines expériences, les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE diagonale non-dénaturante/dénaturante bidimensionnelle.

5

Analyse de la phosphorylation des KARAPs

Après le test kinase *in vitro* et la séparation par SDS-PAGE, les protéines phosphorylées ont été excisées des gels séchés et ont été éluées en utilisant un Centrilutor (Amicon) ou une solution de SDS (dodécylsulfate de sodium) à 0,1% dans du PBS (tampon de phosphate de sodium). Les protéines éluées ont été précipitées dans de l'acide trichloroacétique à 20% à 4°C pendant 2 heures, préalablement à une incubation dans 200 µl d'HCl 5,7 M à 110°C pendant 90 minutes. Les acides aminés individuels ont alors été séchés et remis en suspension dans 5 µl de tampon TLE (voir réactifs) contenant 5 µg de chaque phosphotyrosine, phosphothréonine, phosphosérine non marquée (Sigma) en tant qu'étalons standards. Les échantillons ont été déposés sur des plaques de cellulose (DC-cellulose 100-µm) et mis à migrer à 1500 V pendant 45 minutes à 4°C sur un Multiphor II (Pharmacia). Des étalons standards ont été développés à l'aide de ninhydrine à 1% dans de l'acétone et les acides aminés marqués au ³²P ont été identifiés par autoradiographie.

20

Analyse par immunotransfert

Les immunoprécipités ont été résolus par SDS-PAGE, transférés sur filtres de nitrocellulose et confrontés aux sondes anticorps anti-CD3ζ ou anti-FCεRIγ diluées dans une solution de PBS à 5% en lait déshydraté écrémé. Les

25

immunotransferts ont été révélés en utilisant un antisérum de chèvre anti-souris ou anti-lapin conjugué à la peroxydase de raifort (Sigma références A-2304 et A-0545 respectivement) et le système de détection ECL commercialisé par Amersham (RPN 2209).

5

2. Résultats

Phénotype de surface

10

Le phénotype de surface des cellules NK issues de patients LDGL et cultivées sur IL-2 (interleukine-2) a été analysé par FACScan (tri de cellules activées par fluorescence) en immunofluorescence indirecte.

15

Sont ci-après reportés les résultats de l'étude relative à trois de ces patients, ci-après nommés R.P., D.F. et MAL.

20

Lesdits résultats sont illustrés par la Figure 1A où est présentée une analyse par FACScan en immunofluorescence indirecte de cellules LDGL (maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires) R.P., D.F. ou MAL. cultivées sur IL-2. Une immunoglobuline de chèvre anti-souris conjuguée à de l'isothiocyanate de fluoresceine a servi de réactif de seconde étape. Pour chaque type de cellules LDGL (cellules LDGL R.P. pour les analyses présentées dans la bande horizontale supérieure, cellules LDGL D.F. pour celles de la bande horizontale médiane, cellules LDGL MAL. pour celles de la bande horizontale inférieure) et pour chaque traitement subi (traitement témoin C pour les graphes présentés à gauche ou traitement par l'anticorps monoclonal indiqué, soit de gauche à droite, anti-CD3, anti-CD16, anti-CD158 EB6, anti-CD158 GL183,

25

anti-CD158 PAX 250), sont reportées, en abscisse, les intensités de fluorescence et, en ordonnées, le nombre relatif de cellules.

On peut observer que :

- 5 - les cellules NK R.P., D.F. et MAL. sont toutes CD3⁺ et CD16⁺,
- les cellules NK R.P. sont p50.1⁺, p50.2⁺, p50.3⁺ : elles sont reconnues par l'anticorps monoclonal anti-CD158 EB6 et ne sont pas reconnues par les anticorps monoclonaux anti-CD158 GL183 et PAX250,
- les cellules NK D.F. sont p50.1⁺, p50.2⁺, p50.3⁺ : elles sont reconnues par l'anticorps monoclonal anti-CD158 GL183 et ne sont pas reconnues par les anticorps monoclonaux anti-CD158 EB6 et PAX250,
- 10 - les cellules NK MAL. sont p50.1⁺, p50.2⁺, p50.3⁺ : elles sont reconnues par l'anticorps monoclonal anti-CD158 PAX250 et ne sont pas reconnues par les anticorps monoclonaux anti-CD158 EB6 et GL183.

15 Les trois patients atteints de LDGL ont donc présenté une lymphoprolifération de cellules NK reconnue par des anticorps anti-CD158 : anti-KIR p58.1 (EB6), anti-KIR p58.2 (GL183) et anti-KAR p50.3 (PAX250) respectivement. Trois groupes de cellules NK ont ainsi pu être définis : cellules
20 LDGL R.P., cellules LDGL D.F. et cellules LDGL MAL.

Test cytolytique

25 Des essais de cytotoxicité re-dirigée utilisant P815 en tant que cellules cibles FcγR⁺ ont été réalisés pour les cellules NK R.P. p50.1⁺, D.F. p50.2⁺ et MAL. p50.3⁺.

Les résultats sont illustrés par la Figure 1B où est présenté un test de cytotoxicité re-dirigée avec différents anticorps monoclonaux : des cellules NK issues des donneurs indiqués (R.P. p50.1⁺ à gauche, D.F. p50.2⁺ au centre, ou MAL. p50.3⁺ à droite) et cultivées sur IL-2 ont été utilisées comme cellules effectrices. Le test a été réalisé en présence de : aucuns anticorps (cercles blancs), anticorps monoclonal anti-CD16 (triangles noirs), anticorps monoclonal anti-CD56 (triangles blancs), anticorps monoclonal anti-CD158 (EB6 pour R.P., GL183 pour D.F. et PAX250 pour MAL.) (cercles noirs). En abscisse sont reportés les ratios cellules effectrices : cellules cibles (E:T) et, en ordonnées, le pourcentage de lyse spécifique.

Les tests de cytotoxicité re-dirigée indiquent que, par contraste avec ce qui est observé lors d'une stimulation de récepteurs KIRs, l'addition d'anticorps anti-CD158 aux cellules NK augmente considérablement la cytolyse des cellules P815 (Figure 1B).

A titre de témoins, les anticorps monoclonaux anti-CD16 augmentent la cytolyse spontanée des P815 de manière similaire aux anticorps monoclonaux anti-CD158, alors qu'un anticorps monoclonal anti-CD56 apparié à l'isotype n'a aucun effet (Figure 1B).

Ces cellules NK expriment donc à leur surface des KARs, l'isoforme activatrice des KIRs. Ces résultats ont été, de plus, confirmés par analyses PCR (amplification en chaîne par polymérase) avec transcriptase inverse des ADNc KIR/KAR.

Analyse des KARs exprimés par radio-ioduration et immunotransferts : identification des KARAPs

Les récepteurs KARs exprimés sur les cellules NK issues de patients LDGL ont été analysés par radio-ioduration interne suivie d'immunoprécipitation.

Les résultats sont illustrés par la figure 2A où est présentée une analyse SDS-PAGE, sur gel à 13% en conditions dénaturantes, réalisée à partir de
 5 cellules NK (10×10^6 cellules/piste) de donneur R.P. ($p50.1^+$) radiomarquées au ^{125}I et immunoprécipitées à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-CD158 EB6 (piste 1), puis purifiées à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-CD3 ζ /anti-FC ϵ RI γ (pistes 2 à 7) et enfin re-immunoprécipitées à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-CD158 EB6 (piste 8).

10 Les mêmes profils ont été obtenus avec les donneurs D.F. ($p50.2^+$) et MAL. ($p50.3^+$) (données non présentées).

On peut observer que les immunoprécipités d'anticorps anti-CD158 préparés à partir de lysats de cellules NK contiennent, en plus des KARs
 15 observés à ≈ 50 kDa, une bande de masse moléculaire plus faible migrant à 12 ± 1 kDa environ.

Il a été montré que les KIRs s'associent avec les polypeptides CD3 ζ et FC ϵ RI γ dans les cellules NK humaines. Les expériences de pré-épuisements utilisant des anticorps anti-CD3 ζ et anti-FC ϵ RI γ ont éliminé la possibilité que la bande de 12
 20 kDa environ associée au KARs soit CD3 ζ ou FC ϵ RI γ (Figure 2A).

L'ensemble protéique correspondant à cette bande à 12 ± 1 kDa environ a été baptisé KARAPs (*KAR-associated proteins*, protéines associées aux KARs).

Ces résultats ont été confirmés par des expériences d'immunotransferts qui
 25 ont révélé l'absence de toute bande réactive en présence d'anticorps anti-CD3 ζ dans les immunoprécipités de mAbs anti-CD158 préparés à partir de lysats NK.

Ces résultats, obtenus en présence d'anticorps anti-CD3 ζ , sont illustrés par la figure 2B où est présentée une analyse de lysats complets de cellules D.F. ou d'immunoprécipités de tels lysats par résolution SDS-PAGE sur gel à 15% en conditions dénaturantes et incubation des filtres de nitrocellulose avec une sonde anticorps monoclonal anti-CD3 ζ . Les lysats complets de cellules (LCC) D.F. ont été déposés à 5×10^6 cellules/piste en piste 1, les immunoprécipités de tels lysats à 15×10^6 cellules/piste en pistes 2 à 4. Les immunoprécipitations ont été réalisées sur des lysats de cellules D.F. en utilisant l'anticorps monoclonal anti-Fc ϵ RI α BC4 en témoin piste 2, l'anticorps monoclonal anti-CD16 en piste 3 et l'anticorps monoclonal anti-CD158 GL183 en piste 4.

Les mêmes résultats ont été obtenus pour les cellules R.P. et MAL., à l'aide de mAb anti-CD3 ζ .

Les résultats obtenus à l'aide de mAb anti-Fc ϵ RI γ (données non présentées) ont apporté la même confirmation.

Analyse des KARAPs par test kinase *in vitro* et électrophorèse sur couche mince (TLE)

Les tests kinase *in vitro* réalisés sur les immunoprécipités d'anticorps monoclonaux anti-CD158 ont révélé que les KARs s'associent à une phosphoprotéine prédominante de faible poids moléculaire migrant à environ 14 ± 1 kDa dans les cellules NK.

Les résultats sont illustrés par la figure 3A : des lysats préparés à partir de cellules NK MAL. ont été immunoprécipitées avec l'anticorps indiqué (anti-Fc ϵ RI α en piste 1, anti-CD16 en piste 2, anti-CD158 en piste 3) préalablement à

des tests kinase *in vitro*. Les protéines phosphorylées ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel à 15% en conditions dénaturantes.

Ces résultats sont en accord avec le changement de masse moléculaire attendue pour la forme phosphorylée de la KARAP à 12 kDa observée par ioduration interne. De plus, les immunoprécipités de mAbs anti-CD158 préparés à partir de cellules NK KAR⁺ comprennent deux autres phospho-KARAPs, migrant à 16 ± 1 kDa et 12 ± 1 kDa respectivement (Figure 3A).

L'association des KARs avec un groupe similaire de KARAPs phosphorylées a aussi été observée avec un panel de clones de cellules NK KAR⁺ et était absente de clones NK KIR⁺. Il a été observé que l'intensité relative des phospho-KARAPs à 16,14 et 12 kDa peut varier selon l'origine des cellules NK.

Une analyse des acides aminés phosphorylés a révélé que la KARAP majeure à 14 kDa est principalement phosphorylée au niveau des résidus tyrosine.

Les résultats sont illustrés par la figure 3C : les bandes KARAPs (à gauche) et CD3 ζ (à droite) ont été excisées après test kinase *in vitro* et soumises à une analyse des acides aminés phosphorylés par électrophorèse sur couche mince. Dans cette expérience, les bandes KARAPs et CD3 ζ ont été isolées à partir d'immunoprécipités d'anticorps monoclonaux, respectivement, anti-CD158 et anti-CD16 préparés à partir de lysats de cellules NK. R.P.

Néanmoins, une phosphorylation au niveau de résidus sérine mais non au niveau de résidus thréonine peut aussi être détectée. A titre de témoin, l'analyse des acides aminés phosphorylés a confirmé la phosphorylation de CD3 ζ au niveau du résidu tyrosine seulement.

KARAPs et transduction du signal activateur (tranfectants KAR⁺)

Par contraste avec les KIRs p58.2, l'expression de KAR p50.2 dans les transfectants de la lignée cellulaire non lymphoïde RBL-2H3 ne conduit pas à une reconstitution de la fonction activatrice des KARs p50.2. En effet, la stimulation de transfectants de cellules RBL-2H3 p50.2⁺ induite par des anticorps anti-CD158 ne conduit à aucune mobilisation détectable du Ca²⁺ intracytoplasmique, ni à aucune libération détectable de sérotonine.

De manière remarquable, les tests kinase *in vitro* réalisés sur les immunoprécipités d'anticorps monoclonaux anti-CD158 préparés à partir de transfectants de cellules RBL-2H3 p50.2⁺ n'ont inclus aucune KARAP détectable.

Les résultats sont illustrés par la figure 3B : des lysats préparés à partir de cellules RBL-2H3 p50.2⁺ ont été immunoprécipitées avec l'anticorps indiqué (anti-CD3ε en piste 1, anti-FcεRIα en piste 2, anti-CD158 en piste 3) préalablement à des tests kinase *in vitro*. Les protéines phosphorylées ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel à 15% en conditions dénaturantes.

Le défaut d'association des KARs aux KARAPs dans les transfectants de cellules RBL-2H3 p50.2⁺ a été également confirmé par ioduration interne (données non présentées).

Les KARAPs s'associent donc de manière sélective aux KARs, et l'absence d'association des KARs aux KARAPs est corrélée avec l'incapacité des KARs à transduire un quelconque signal activateur détectable.

Association KAR-KARAPs (gel diagonal)

Finalement, une analyse sur gel bidimensionnel diagonal des immunoprécipités d'anticorps monoclonaux anti-CD158 a révélé que les phospho-KARAPs de 16, 14 et 12 kDa environ décroissent le long du gel diagonal.

Les résultats sont illustrés par la figure 4 : des immunoprécipités (IP) d'anticorps monoclonaux anti-CD158 préparés à partir de lysats de cellules NK R.P. ont été soumis à un test kinase *in vitro* préalablement à analyse par SDS-PAGE sur gel à 13% bidimensionnel en conditions non-dénaturantes/(direction horizontale)/dénaturantes (direction verticale).

Ces résultats indiquent ainsi que les KARs sont associés dans les cellules NK à un complexe de dimères KARAPs liés par liaison disulfure.

3. Discussion

Les KARs, récepteurs activateurs autonomes des molécules du CMH de classe I ou co-récepteurs du TCR (récepteur de lymphocyte T) ou de RFc (récepteur pour fragment constant d'immunoglobuline), représentent une voie nouvelle pour l'activation des cellules NK et T.

Les inventeurs ont démontré que les KARs sont en fait assemblés dans les cellules NK en un complexe multimérique faisant intervenir des KARAPs associées sous forme de dimères liés par liaison disulfure.

Si l'analyse par radio-ioduration a mis en évidence une KARAP à environ 12 ± 1 kDa, l'analyse par test kinase a mis en évidence trois phospho-KARAPs à environ 16, 14 et 12 ± 1 kDa.

La corrélation entre l'association des KARs aux KARAPs et la fonction activatrice des KARs suggère que les KARAPs agissent en tant que sous-unités transductrices du complexe KAR multimérique.

Cependant, l'absence d'association des KARs aux KARAPs, telle qu'observée pour les transfectants de cellules RBL-2H3, n'empêche pas l'expression du récepteur sur la surface cellulaire, contrairement à ce qui a été observé pour les récepteurs activateurs multimériques pour antigènes ou anticorps

incluant des polypeptides à ITAM (motif d'activation d'immunorécepteurs basée sur résidu(s) tyrosine(s)).

D'autres récepteurs activateurs, ou à tout le moins non inhibiteurs, de la superfamille des immunoglobulines ou du type lectine tels que NKG2 C/D, SIRP β et ILT1, présentent de frappantes similarités avec les KARs.

Ces similarités sont illustrées par la figure 5 où sont présentés les récepteurs activateurs ou non-inhibiteurs de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) ou du type lectine, et leurs contreparties inhibitrices. En dessous du nom de chaque couple de récepteurs, sont indiquées les cellules les exprimant naturellement. Les récepteurs activateurs ou non-inhibiteurs ne présentent ni ITIM (motif d'inhibition d'immunorécepteur basée sur résidu(s) tyrosine) ni ITAM (motif d'activation d'immunorécepteur basée sur résidu(s) tyrosine) mais présentent un résidu acide aminé chargé dans leur domaine transmembranaire (TM) (R = arginine, K= lysine, D=acide aspartique, E=acide glutamique). Les contreparties inhibitrices (de gauche à droite, ILT2/ILT1, SIRP α /SIRP β , KIR/KAR, NKG2A/B/NKG2C/D) comportent un motif ITIM dans leur partie intracytoplasmique (IC). Chaque récepteur activateur, ou non-inhibiteur, présente, au niveau extracytoplasmique (EC), une forte homologie avec sa contrepartie inhibitrice.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide tel qu'obtenu :

- 5 i. par immunoprécipitation d'une ou plusieurs fraction(s) polypeptidique(s) de lysats de cellules NK et/ou T à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR, tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,
- 10 ii. chaque fraction polypeptidique pouvant optionnellement être plus avant épuisée par élimination des fractions immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et/ou anti-FcεRIγ, et/ou être à nouveau précipitée à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,
- 15 iii. par résolution des polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire, et récupération des polypeptides correspondant à un poids moléculaire de 12 ± 1 kDa environ, ou bien
- 20 par résolution des polypeptides de ladite (desdites) fractions polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire après avoir soumis ladite (lesdites) fraction(s) polypeptidique(s) à un test kinase, et récupération des polypeptides correspondant à un poids moléculaire de 12, 14 et/ou 16 ± 1 kDa environ, ou fragment d'un tel polypeptide.

2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est phosphorylé au

25 niveau d'au moins un résidu tyrosine et/ou d'au moins un résidu sérine.

3. Polypeptide selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il se lie à une molécule à domaine SH2 ou PTB.

5 4. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est modifié par glycosylation, phosphorylation, sulfonation, biotinylation, acylation, estérification, par addition, substitution ou suppression d'entités de forme moléculaire proche de celle des groupes phosphate telles que le phosphonate, par addition de réactifs de marquage tels que la luciférase, la GFP (*Green Fluorescence Protein*), par addition de cibles de purification telles qu'un ligand d'affinité, par addition d'entités modifiant sa solubilité.

10 5. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications, caractérisé en ce qu'il est capable de traverser une membrane cellulaire.

15 6. Anticorps ou fragment d'un tel anticorps, en particulier fragment Fc, Fv, Fab, F(ab)'2, tel qu'obtenu par immunogénèse à partir d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou à partir d'un fragment d'un tel polypeptide.

20 7. Acide nucléique ou variant d'un tel acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence correspondant à la lecture en cadre ouvert, selon le code génétique universel, de la séquence en acides aminés d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

25 8. Procédé d'obtention d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes :

i. d'immunoprécipitation d'une ou plusieurs fraction(s) polypeptidique(s) de lysats de cellules NK et/ou T à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR, tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

ii. chaque fraction polypeptidique pouvant optionnellement être plus avant épuisée par élimination des fractions immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-CD3 et/ou anti-FcεRIg, et/ou être à nouveau précipitée à l'aide d'un ou plusieurs anticorps anti-KIR et/ou anti-KAR tel(s) qu'un anticorps anti-CD158, anti-p70/NKB1, anti-p140, et plus particulièrement l'anticorps monoclonal EB6, GL183 ou PAX250,

iii. de séparation les polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire et récupérer les polypeptides correspondant à un poids moléculaire de 12 ± 1 kDa environ, ou bien

de séparation des polypeptides de ladite (desdites) fraction(s) polypeptidique(s) selon leur poids moléculaire après avoir soumis ladite (lesdites) fraction(s) polypeptidique(s) à un test kinase, et récupérer les polypeptides correspondant à un poids moléculaire de 12, 14 et/ou 16 ± 1 kDa environ.

9. Composition pharmaceutique comprenant, en association avec un véhicule pharmaceutiquement inerte, une quantité efficace de polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, ou de fragments de tels polypeptides, ou une quantité efficace d'anticorps selon la revendication 6, ou de fragments de tels anticorps, ou une quantité efficace d'acides nucléiques selon la revendication 7, ou de variants de tels acides nucléiques.

10. Méthode de diagnostic *in vitro* d'un fonctionnement anormal ou non désiré d'une cellule, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de:

- mise en contact d'au moins une cellule, ou un extrait de cellule, avec un anticorps selon la revendication 6 ou un fragment d'un tel anticorps, ou avec un acide nucléique selon la revendication 7 ou un variant d'un tel acide nucléique, et de

- révélation du produit de réaction éventuellement formé.

11. Méthode de diagnostic *in vitro* selon la revendication 10, caractérisée en ce que ledit fonctionnement anormal ou non désiré se traduit par une maladie immunoproliférative, une maladie d'immunodéficience telle qu'une maladie à VIH, un cancer tel que la maladie lymphoproliférative des lymphocytes granulaires, une maladie auto-immune telle que la polyarthrite rhumatoïde, une maladie infectieuse telle que le paludisme, une réponse allergique, un rejet de greffe.

12. Méthode d'identification de molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de :

i. mise en contact des molécules candidates avec des polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 (ou avec des fragments de tels polypeptides), et de

ii. sélection de celles des molécules candidates pour lesquelles une liaison auxdits polypeptides (ou auxdits fragments de polypeptides) est observée.

13. Méthode d'identification de molécules capables de moduler une activité cellulaire résultant de l'activation d'un KAR, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de :

i. mise en contact des molécules candidates avec des molécules adaptatrices ou effectrices de l'activation d'un KAR telles qu'obtenues par la méthode selon la revendication 12 et avec des polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 (ou avec des fragments de tels polypeptides),

5 et de

ii. sélection de celles des molécules candidates qui exercent un effet sur la liaison entre lesdits polypeptides (ou lesdits fragments de polypeptides) et lesdites molécules adaptatrices ou effectrices, telle qu'observée en l'absence desdites molécules candidates.

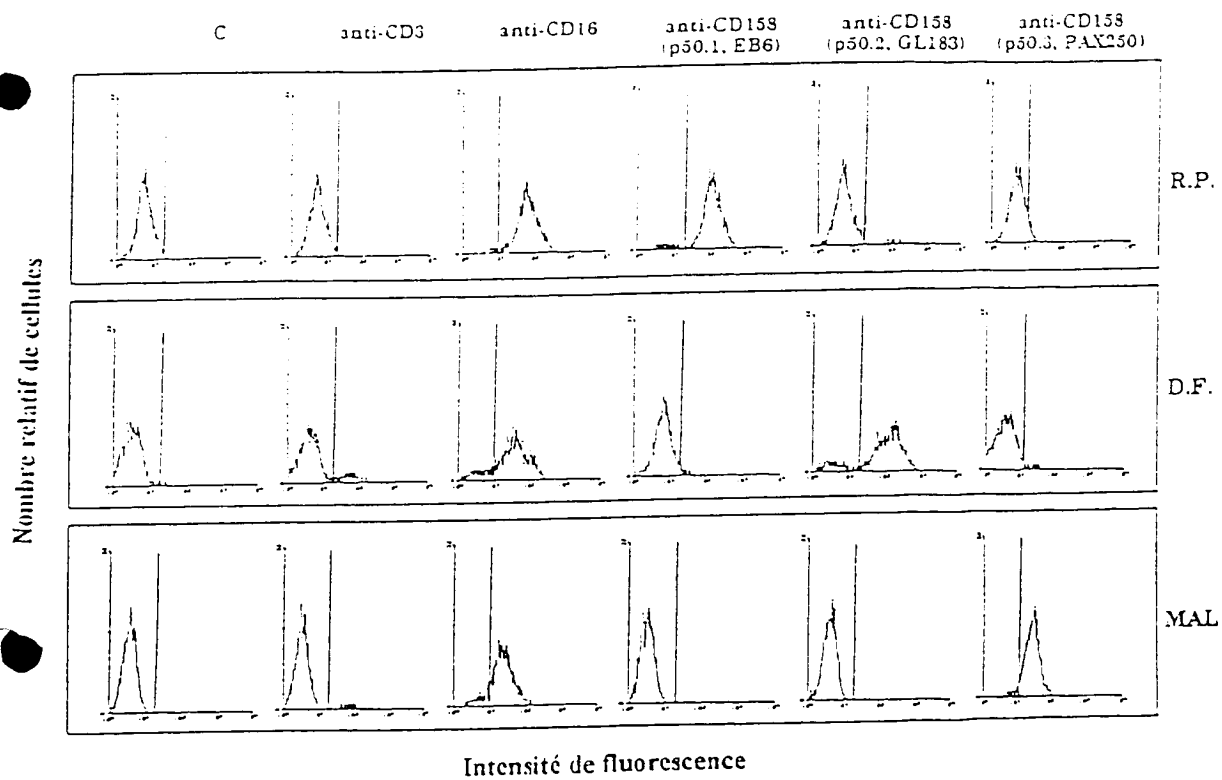


Figure 1 A

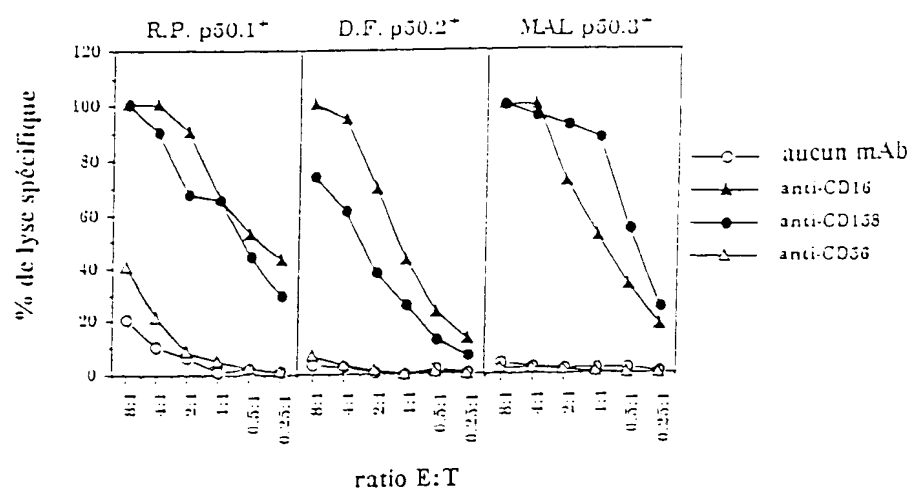
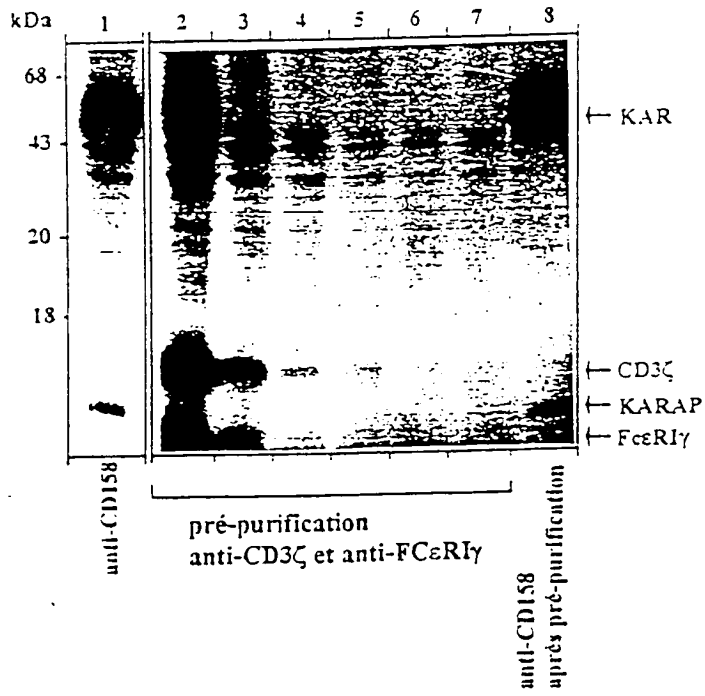


Figure 1 B

A



B

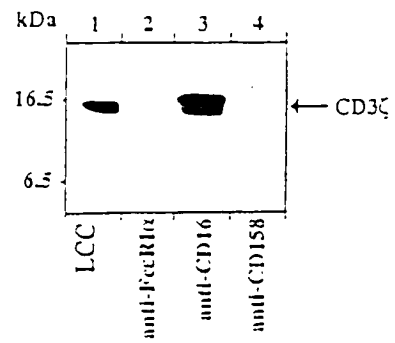
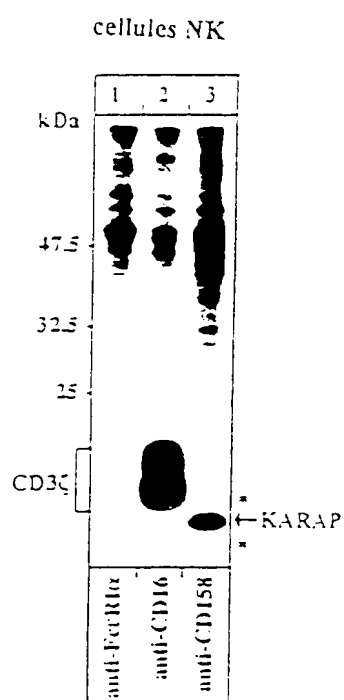
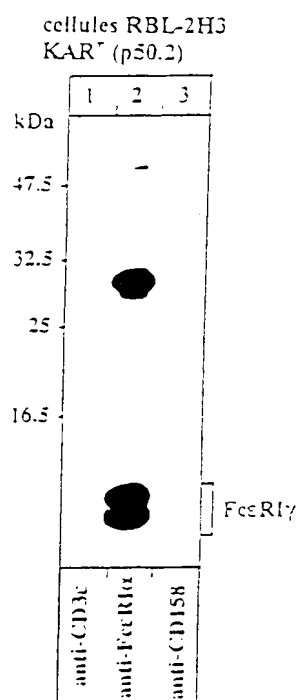


Figure 2 A, B

A



B



C

Analyse des acides phosphoaminés

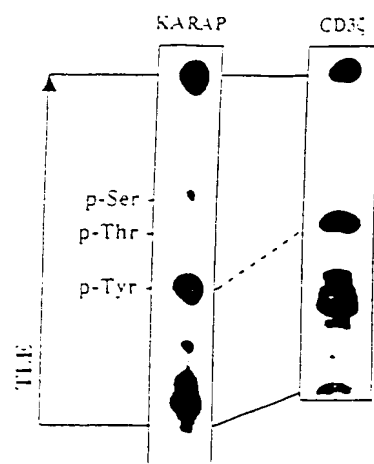


Figure 3 A, B, C

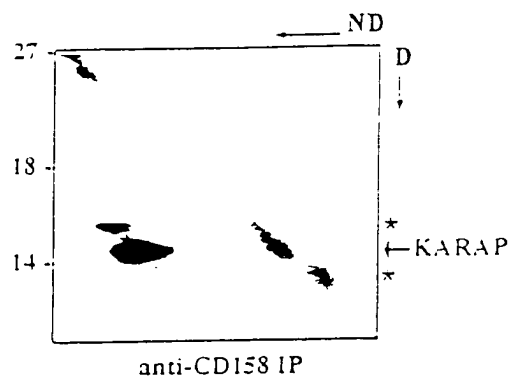


Figure 4

Ig SF ————— de type lectine

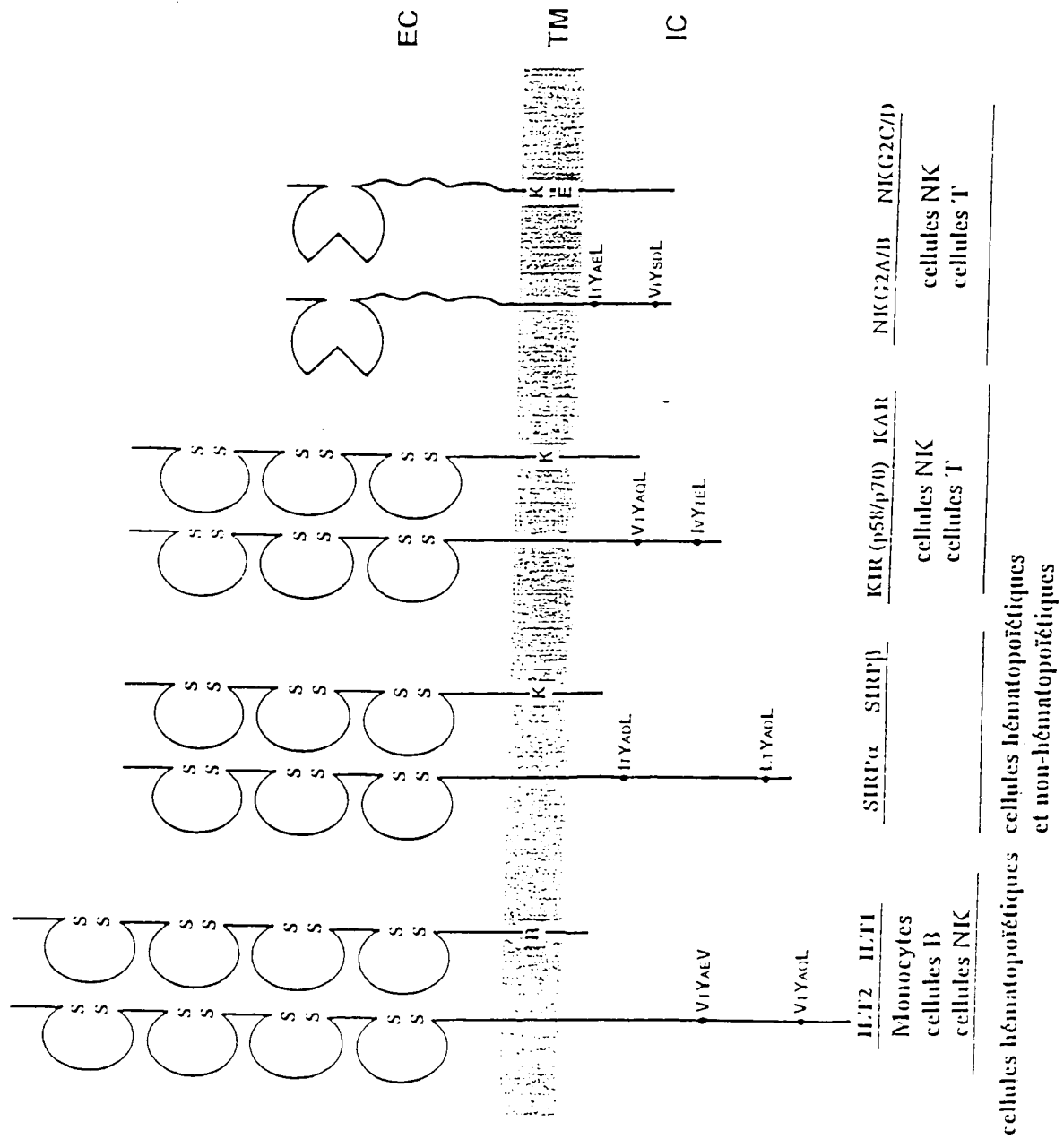


Figure 5

